

气相色谱法测定蔬菜中三碘苯甲酸残留量

周艳明, 付婷, 胡睿

(沈阳农业大学分析测试中心, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 建立三碘苯甲酸残留量的气相色谱测定方法, 选取西红柿等6种基质, 样品经0.1mol/L盐酸酸化, 以二氯甲烷为提取剂, 超声波提取, 用三甲基硅重氮甲烷进行甲酯化, 经弗罗里硅土固相萃取柱净化后上机测定, 采用电子捕获检测器测定, 保留时间定性, 外标法定量。并对该方法的灵敏度、准确度和精密度进行实验, 三碘苯甲酸的最低检出限可达0.001mg/kg, 各水平的添加回收率为70%~95.7%。该方法可靠、灵敏、简便可行, 可为制定国家标准分析方法提供参考。

关键词: 三碘苯甲酸; 蔬菜; 衍生反应; SPE净化; 气相色谱

GC Determination of 2,3,5-Triiodobenzoic Acid Residue in Vegetables

ZHOU Yan-ming, FU Ting, HU Rui

(Analysis and Testing Center, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: A gas chromatographic (GC) method was developed for the determination of 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) in vegetables. The main steps in sample preparation prior to the injection of processed samples into a GC system equipped with an electron capture detector consisted of acidification with 0.1 mol/L hydrochloric acid, extraction with methylene dichloride under ultrasonic assistance, methylation with trimethylsilyl diazomethane and clean-up on a florisil solid phase extraction (SPE). Retention time was used for qualification and external standard method for quantification. Some figures of merit the method developed including sensitivity, accuracy and precision were evaluated. This method exhibited a limit of detection of 0.001 mg/kg for TIBA. Mean recoveries for the analyte in 6 vegetable matrices ranged from 70% to 95.7%. These results suggest that this method is reliable, sensitive, simple and convenient and can provide useful references for the establishment of a national standard method for the determination of TIBA.

Key words: 2,3,5-triiodobenzoic acid; vegetables; derivation; SPE purification; gas chromatography

中图分类号: TS207.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)12-0178-04

植物生长调节剂(plant growth regulators)是一类与植物激素具有相似生理和生物学效应的物质。它们在农业生产中主要有以下作用特点: 作用面广, 应用领域多, 用量小, 速度快, 效益高, 可对植物的外部性状与内部生理过程进行双调控, 针对性强, 专业性强。它主要分为三大类: 植物生长促进剂、植物生长抑制剂和植物生长延缓剂。

三碘苯甲酸(2,3,5-triiodobenzoic acid, TIBA), 是常用的植物生长抑制剂, 是一种阻止生长素运输的物质, 可抑制顶端分生组织, 促进腋芽萌发。早在1910年即合成成功, 到1947年, TIBA被施用于大豆, 发现可使大豆开花数目增加。经研究它对豆科作物和果菜有增花保荚、改变株形、矮化壮秆、促进早熟的作用^[1]。另

外庞基良等^[2]证明了三碘苯甲酸和多效唑(pacloburirazol, PP333)可对黄瓜去顶苗成花有非常显著的协同促进效应。三碘苯甲酸分子式见图1。

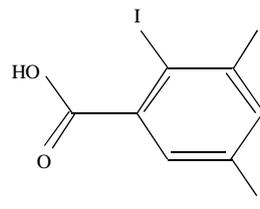


图1 三碘苯甲酸结构式

Fig.1 Chemical structure of TIBA ($C_7H_3I_3O_2$, $M_r=499.81$)

目前美国、德国等国家均对其规定了测定方法。

收稿日期: 2009-06-15

基金项目: 2006年国家标准委员会检测方法标准制定项目(20010670-T-560)

作者简介: 周艳明(1955—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为食品质量与控制。E-mail: syauzym@163.com

而我国国家标准中尚无三碘苯甲酸残留量的测定方法,与测定相关的内容也鲜见文献报道。本方法采用二氯甲烷提取,柱前衍生,SPE净化,气相色谱配电子捕获检测器测定,旨在建立一种高效快速、简便安全、经济灵敏的蔬菜中三碘苯甲酸残留量的测定方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

西红柿、黄瓜、茄子、角瓜、豆角、苦瓜均为市购。

三碘苯甲酸(TIBA)标准品(纯度≥98%)、正己烷(色谱纯)、甲醇(色谱纯) Dikma公司;三甲基硅重氮甲烷(2mol/L)的正己烷溶液 上海安谱生物科技有限公司;二氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷、甲醇、盐酸(均为分析纯) 国药集团;氯化钠、无水硫酸钠(650℃灼烧4h备用) 沈阳化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

6890N型气相色谱仪(配有电子捕获检测器(ECD)及7683B自动进样器) 美国Agilent公司;弗罗里硅土固相萃取小柱(1000mg/6mL);分析天平(感量0.0001g和0.01g);KQ-500DB数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;RE-52AA旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱:HP-1(30m×0.32mm,0.25μm);载气(N₂)流速1.0mL/min;进样口温度260℃;检测器温度350℃;进样量1μL;不分流进样。程序升温:初始温度110℃,以20℃/min的速度升至230℃,保持1min,再以25℃/min的速度升至280℃,保持3min。

1.3.2 样品前处理

称10g(精确至0.01g)匀浆试样于100mL三角瓶中,加0.1mol/L盐酸10mL^[3],二氯甲烷30mL,超声20min,抽滤,残渣加入二氯甲烷20mL,超声20min,抽滤,合并滤液入分液漏斗,加入1g氯化钠,轻轻振摇30s,静置分层。取二氯甲烷层,加入适量无水硫酸钠,38℃旋转蒸干^[4]。

加入0.4mL甲醇,1.6mL乙酸乙酯和10μL三甲基硅重氮甲烷^[5-6],密封,混匀,超声10min,46℃旋转蒸干。

取弗罗里固相萃取小柱,用2mL正己烷活化,2mL正己烷溶解残渣上样,5mL洗脱液(正己烷:乙酸乙酯=9:1,V/V)洗脱,收集后3.5mL洗脱液。40~45℃旋转蒸干,1mL正己烷(色谱纯)定容,待测。

2 结果与分析

2.1 衍生反应条件的优化

甲酯化试剂中,效率最高的衍生试剂是重氮甲烷,它反应迅速,成本低,副产物较少,但是它的制备过程复杂且易燃易爆,而且试剂毒性较大,不易保存。三甲基硅重氮甲烷(TMSCHN₂)是重氮甲烷的安全替代物,市场上有商品化的溶液出售,通常为正己烷或乙醚溶液,该试剂比较稳定,在-20℃可长期保存。它在有甲醇存在条件下,和羧酸发生甲酯化反应,反应机理见图2。

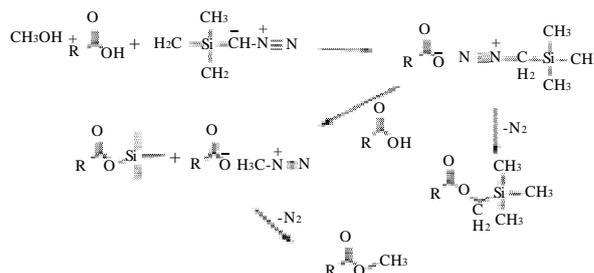


图2 三甲基硅重氮甲烷与羧酸的酯化反应机理

Fig.2 Methylation mechanism of TMSCHN₂ and carboxylic acids

影响该反应的条件主要有反应时间和衍生试剂的用量,本实验对这两个条件进行了优化,结果见图3、4。

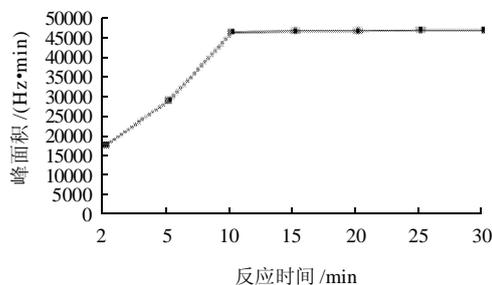


图3 衍生反应与时间的关系

Fig.3 Effect of derivation time on the amount of target derivatives

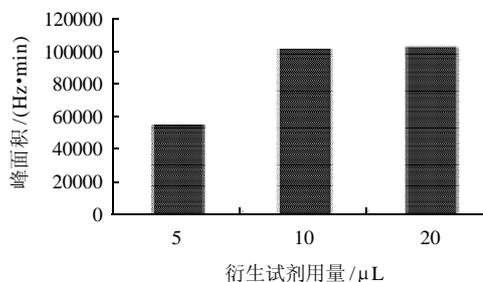


图4 衍生试剂用量对衍生反应的影响

Fig.4 Effects of TMSCHN₂ amount on the amount of target derivatives

当衍生时间小于10min时,随着反应时间的延长,标样峰面积逐渐增大,但当衍生时间大于10min时,标

样的峰面积基本不变,为了节省前处理的时间,最后确定衍生反应时间为10min。

随着衍生试剂用量的增大,标样的峰面积逐渐增大,当衍生试剂的量大于10 μ L时,峰面积增加的很小,为了避免浪费和减少环境污染,因此确定衍生试剂的用量为10 μ L。

2.2 标准曲线和线性范围

标准储备液的配制:准确称取三碘苯甲酸标准品25mg用甲醇溶解后,定容到250mL容量瓶,制成100 μ g/mL的标准储备液。

标准工作液的制备:用微量移液管量取标准储备液置于10mL容量瓶,用甲醇定容,逐级稀释成10、1、0.1、0.01 μ g/mL系列标准工作液,在4 $^{\circ}$ C冰箱内保存。经衍生后上机测定,以峰面积为纵坐标(Y)、质量浓度为横坐标(X),得到线性方程为 $Y=51353X-48.97$,相关系数 $R^2=1$,当标样质量浓度大于20 μ g/mL时,色谱峰超过仪器的线性范围,出现平头峰,所以,确定三碘苯甲酸的线性范围是0.01~20 μ g/mL。

2.3 标样的精密度分析

在不同时间,对5个质量浓度的三碘苯甲酸标准溶液进行测定,所得峰面积、标准偏差及相对标准偏差RSD值见表1。

表1 标准溶液的GC测定值、S值及RSD值

Table 1 Precisions of the method studied using TIBA standard solutions of different concentrations

标准液质量浓度/ μ g/mL	测定次数					标准偏差	RSD/%
	1	2	3	4	5		
0.01	545.5	562.3	599	578.2	557.1	20.7	4.0
0.5	25438.2	26356.1	26645.4	25178.9	25673.2	620.4	2.4
1	48735	49127	49983	48765	49237	505.1	1.03
2.5	109824	118924	117470	112375	109837	4277.9	3.76
4	213489	218951	205650	200717	210281	7023.2	3.3

由表1可知,各质量浓度的相对标准偏差在1.03%~4.0%之间,符合要求。

2.4 蔬菜实际样品添加回收率实验

表2 样品的回收率结果(n=6)

Table 2 Recoveries for TIBA in 6 vegetable matrices (n=6) %

样品名称	添加量1		添加量2		添加量3	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
西红柿	81	6.23	93.7	4.18	95.7	1.16
黄瓜	74.9	8.15	91	6.53	94	2.84
茄子	70	10.32	81.2	7.44	89.3	3.33
角瓜	78.4	7.18	85.3	5.51	90.4	2.57
豆角	72.3	9.34	83.9	6.37	88.5	4.89
苦瓜	70.2	6.59	80.6	4.27	93.5	3.31

取1/10限量0.005mg/kg(添加量1)、最高允许限量0.05mg/kg(添加量2)和10倍限量0.5mg/kg(添加量3)3个浓度点考察回收率。每种蔬菜分别做3个浓度添加,每个浓度添加分别做3个平行,结果见表2。

由表2可知,各浓度的添加回收率范围为70%~95.7%,相对标准偏差为1.16%~10.32%之间,均符合农药残留分析的要求。

2.5 灵敏度实验

美国规定苹果中三碘苯甲酸的最大允许残留限量是0.05mg/kg,我国尚无相关规定,本实验测定样品为蔬菜,因此参照其在水果中的最高允许残留限量,方法的检出限(LDL)应不高于0.05mg/kg。对西红柿样品分别添加0.005、0.05mg/kg和0.5mg/kg三碘苯甲酸,并分别做3次平行实验,结果发现添加0.005mg/kg时回收率平均值不高于80%,而添加0.05mg/kg时,回收率稳定,且相对较高,而且此添加浓度正好等于美国规定的最大允许残留限量,因此根据图7得到信噪比 $R_{SN}=150$,按式(1)计算出检出限为0.001mg/kg。

$$C_L = \frac{3 \times c}{R_{SN}} \quad (1)$$

式中: c 为样品添加浓度/(mg/kg), R_{SN} 为信噪比, C_L 为检出限/(mg/kg)。

2.6 测定方法分析

三碘苯甲酸0.5 μ g/mL标准溶液色谱图,西红柿样品空白色谱图和西红柿添加浓度为0.05mg/kg标准品的色谱图分别见图5~7。

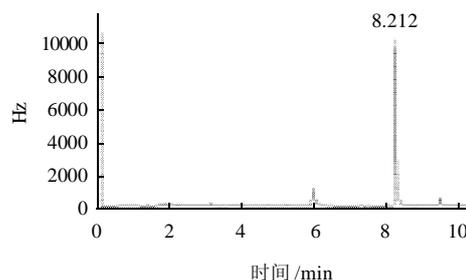


图5 三碘苯甲酸标准溶液色谱图(0.5 μ g/mL)

Fig.5 GC chromatogram of TIBA standard (0.5 μ g/mL)

通过比较图5~7可见,西红柿样品在三碘苯甲酸出峰位置无杂质干扰。三碘苯甲酸标准溶液色谱图谱峰及西红柿样品添加0.05mg/kg三碘苯甲酸标准品的色谱峰均有足够的信噪比,峰型对称性均良好。

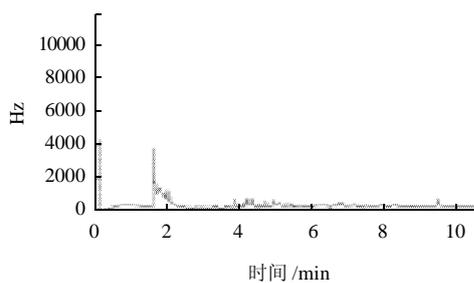


图6 西红柿空白样品色谱图

Fig.6 GC chromatogram of a blank tomato sample

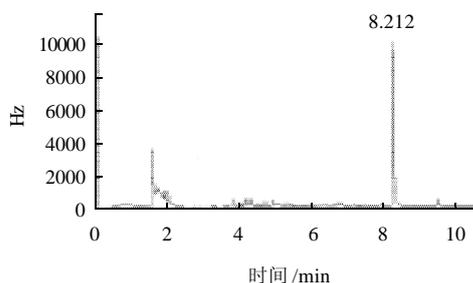


图7 西红柿添加0.05mg/kg三碘苯甲酸标准品的色谱图

Fig.7 GC chromatogram of a tomato sample spiked at 0.05 mg/kg

3 结论

上述实验数据和图谱表明,该方法简便安全、线性范围宽、相关度高、精密度好、回收率高、灵敏度低。三碘苯甲酸的检出限为0.001mg/kg,各浓度添加水平回收率介于70%~95.7%之间,添加回收相对标准偏差介于1.16%~10.32%之间。该方法不需要易燃易爆的重氮甲烷、用SPE节省了试剂用量、从样品处理到上机测定仅需1.5h即可完成,符合现代农药残留分析技术的发展趋势。

参考文献:

- [1] 史好新. 2,3,5-三碘苯甲酸合成方法的改进[J]. 安徽师大学报:自然科学版, 1985(2): 62-65.
- [2] 庞基良, 王利琳, 杨霞, 等. 三碘苯甲酸和多效唑对黄瓜去顶苗直接成花的协同促进效应和作用部位(简报)[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(1): 33-35.
- [3] 牟仁祥, 陈铭学. 稻米中13种苯氧羧酸类除草剂多残留的高效液相色谱-质谱测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(9): 973-976.
- [4] US Food and Drug Administration. Pesticide analytical manual[M]. Washington, DC: Department of Health and Human Services, 1994.
- [5] 匡华, 储晓刚, 侯玉霞, 等. 气相色谱法同时测定大豆中13种苯氧羧酸类除草剂的残留量[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(6): 503-508.
- [6] 双草醚监测方法[EB/OL]. [2008-01-24]. <http://www.gbwl14.org/xinwen/upload/html/6/2008-1/3236.html>.